

10 / 528509

PCT/JP03/11895

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

18 MAR 2005
18.09.03

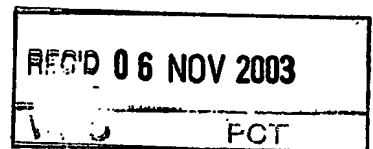
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 6月13日

出願番号
Application Number: 特願2003-169153
[ST. 10/C]: [JP2003-169153]

出願人
Applicant(s): 株式会社オリエントキャンサーセラピー

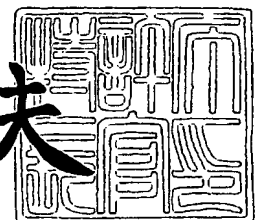


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年10月24日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 3-1107598

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 39/04

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都三鷹市大沢 1 丁目 1 番 2 1 号

 【氏名】 八木田 旭邦

【特許出願人】

 【識別番号】 300040380

 【氏名又は名称】 株式会社オリエントキャンサーセラピー

【代理人】

 【識別番号】 100088904

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 庄司 隆

 【電話番号】 03-3864-6572

【先の出願に基づく優先権主張】

 【出願番号】 特願2002-273738

 【出願日】 平成14年 9月19日

【先の出願に基づく優先権主張】

 【出願番号】 特願2002-281780

 【出願日】 平成14年 9月26日

【先の出願に基づく優先権主張】

 【出願番号】 特願2002-354515

 【出願日】 平成14年12月 6日

【先の出願に基づく優先権主張】

 【出願番号】 特願2003-161238

 【出願日】 平成15年 6月 5日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 067070

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0007304

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ガンの免疫治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 チロシンキナーゼ阻害剤と IL-12 産生誘導剤が併用されることを特徴とするガンの治療剤。

【請求項 2】 チロシンキナーゼ阻害剤が、以下の少なくとも 1 の受容体に対する選択的標的作用を有する請求項 1 のガンの治療剤。

HER2/neu、HER3、HER4、c-kit、PDGFR、bcr-abl、EGFR

【請求項 3】 チロシンキナーゼ阻害剤が、選択的に EGFR 又は c-kit 標的作用を有する請求項 1 のガンの治療剤。

【請求項 4】 IL-12 産生誘導剤が、 $\beta 1,3/1,6$ グルカン構造を有する物質である請求項 1～3 の何れかーに記載のガンの治療剤。

【請求項 5】 IL-12 産生誘導剤が、 $\beta 1,3/1,6$ グルカン構造を有する茸菌糸体由来成分又は酵母由来成分である請求項 4 のガンの治療剤。

【請求項 6】 ガンの化学療法剤及び放射線治療との併用無しに処置される請求項 1～5 の何れかーに記載のガンの治療剤。

【請求項 7】 NKT 細胞の NKR-P1 に選択的に作用して NKT 細胞を活性化をおこす物質と併用される請求項 1～6 の何れかーに記載のガンの治療剤。

【請求項 8】 血管新生阻害能を有する物質と併用される請求項 1～7 の何れかーに記載のガンの治療剤。

【請求項 9】 NKTP 値の投与前値が 5.2% 以上、もしくは $\text{TNF } \alpha$ の投与前値が 2500 pg/ml 以上の測定値を示すことをマーカーとしてチロシンキナーゼ阻害剤と IL-12 産生誘導剤の併用治療が行われる請求項 1～8 の何れかーに記載のガンの治療剤。

【請求項 10】 請求項 1～9 の何れかーに記載のガン治療剤を用いたガンの治療方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】

本発明は、癌治療の新たな領域を提供するものである。すなわち、新規な癌治療法として着目されるチロシンキナーゼ阻害剤と医学博士八木田旭邦が開発したNK細胞の活性化能、NKT細胞の活性化能、血管新生阻害能、IL-12の産生誘導能及びIFN γ の産生誘導能の動態に着目した新免疫療法の併用による新規なガン治療剤の提供に関する。

【0002】

【従来の技術】

ガン (malignant neoplasms) (cancer) の予防または治療のために有用な物質の選別には、従来、ガン細胞へのその直接的作用が重要視されていた。免疫賦活剤がガン治療に有用であることは認められていたが、免疫賦活剤として得られた化合物はいずれもその抗ガン効果が微弱であり、免疫療法単独または化学療法との併用治療によってもガンの十分な治療効果は達成されていない。

【0003】

本発明者の医学博士、八木田は、先にガン治療における画期的な手法として、インターロイキン12 (IL-12) を生体内で誘発する物質の有用性に着目し、キノコ菌糸体加工物がその機能を有することを発見し、新免疫療法 (Novel Immuno therapy for cancer) (NITC) ともいうべきガン治療法を確立した。従来IL-12は、抗ガン効果があるものの生体内にIL-12自体を直接投与した場合には副作用を生じるために患者が治療に耐えられないという事実があり、それ自体を抗ガン剤として使用できなかった。しかし、八木田が報告したキノコ菌糸体加工物を含む製剤は、ガンの治療において著しい治癒・延命効果を達成した。つまり八木田は、IL-12を生体内で誘発できる有効量のキノコ菌糸体加工物を投与することにより、ガンの治療目的を達成した。

【特許文献1】 特開平10-139670号公報

【0004】

IL-12は、TNF α \rightarrow IFN γ \rightarrow IL-12 \rightarrow CTL活性というルートでキラーT細胞の活性化効果と増強効果をもつ。つまりIL-12の産生増強は、キラーT細胞の活性化と増強により抗ガン効果が期待される。

【0005】

八木田は、IL-12の産生増強の系とは別にNKT細胞の活性化が抗ガン効果に有用であることを報告している。谷口等は、NKT細胞が有する $V\alpha 24 V\beta 11$ という特異的なT細胞抗原受容体（TCR）が認識する特異的な糖脂質抗原を発見し、この抗原が、 α ガラクトシルセラミドであることを報告している。更に、 α ガラクトシルセラミドを投与した担ガンマウスでは、NKT細胞が活性化され、ガンの消失はみられないものの転移が抑制されることを証明した。

NKT細胞には、もう一つの受容体としてNK細胞抗原受容体（NKR-P1；ナチュラルキラー受容体P1）があることは報告されている

【非特許文献1】特集 NKT細胞の基礎と臨床：最新医学55巻4号2000年818～823ページ）。

NKR-P1もNKT細胞の活性化に関与し、この活性化が抗ガン効果がより優位であることを八木田は見出している。

【特許文献2】US2002-0010149A1

【0006】

ガンの分子標的治療剤が新タイプの制癌剤として従来の細胞標的治療剤と対比してその意義が着目されている。そのなかでも特にシグナル伝達阻害作用を有する薬剤としてチロシンキナーゼ阻害剤は注目されている。ZD1839（イレッサ：登録商標 アストラゼネカ）はEGFR（上皮成長因子受容体）チロシンキナーゼのATP結合部位におけるATPとの競合作用を有し、チロシンキナーゼの自己リン酸化を抑制することでチロシンキナーゼ活性を抑制する。その結果、EGFRのもつ増殖、浸潤、分化、転移に関連するシグナル伝達〔EGFRの細胞外ドメインに上皮成長因子（EGF）等のリガンドが結合することにより、細胞内ドメインにあるEGFRチロシンキナーゼが活性化し、EGFRの自己リン酸化および種々の細胞内標的たんぱく質のリン酸化を引き起こすことにより細胞表面から核への増殖シグナルが伝達され、癌細胞表面から核への増殖シグナルが伝達され、癌細胞の増殖、浸潤、転移、血管新生を起こす〕を遮断することにより抗癌作用を発現する。IMC-C225（EGFR標的モノクローナル抗体）は細胞膜表面のEGFRレセプター部分を認識し、EGFRの自己リン酸化を抑制することでチロシンキナーゼ活性を阻害する。ハーセプチンはEGFRと相同性をもつHer2/Neuに対するモノクローナル抗体であり、STI-571（

グリベック)はBCR-Ablのチロシンキナーゼ活性の阻害とc-kitのチロシンキナーゼ活性の阻害能を有する。

【非特許文献2】血液・免疫・腫瘍 Vol. 7 No.3 2002-7

【0007】

このような分子標的治療剤は新メカニズのガン治療薬として着目されるが、その効果はいまだ革命的とはいえない。たとえば、ZD1839 (イレッサ)はアストラゼネカ社が新規に開発した強力かつ選択的なEGFRチロシンキナーゼ阻害剤であり、ヒトでもその有用性が判明している。しかし非小細胞肺癌や前立腺癌などでの臨床成績はPR (部分寛解)が10~20数%で、CR (完全寛解)は全くないと言ってもよいが、あっても極くまれで完全寛解まで4ヶ月以上の期間がかかっていた。そこでZD1839 (イレッサ)と各種抗癌剤との併用療法が試みられているものの現時点では相加あるいは相乗効果は得られていない。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記のような分子標的治療薬のより有効な効果をもたらすことを目的とし、完全寛解率を上げ、完全寛解への期間の短縮化を達成し、免疫療法との相乗効果を達成するための手段を提供するものである。つまり、CTL活性、NKT活性、NK活性及び-VEGF等に着目する新免疫療法と分子標的治療薬特にチロシンキナーゼ阻害剤の併用による相乗効果の達成を課題とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明は、チロシンキナーゼ阻害剤とIL-12産生誘導剤の併用がガン治療における優位な相乗効果を達成することを見出し本発明を完成した。

【0010】

すなわち本発明は、

1. チロシンキナーゼ阻害剤とIL-12産生誘導剤が併用されることを特徴とするガンの治療剤。
2. チロシンキナーゼ阻害剤が、以下の少なくとも1の受容体に対する選択的標

的作用を有する前項 1 のガンの治療剤。

HER2/neu、HER3、HER4、c-kit、PDGFR、bcr-abl、EGFR

3. チロシンキナーゼ阻害剤が、選択的EGFR又はc-kit標的作用を有する前項 1 のガンの治療剤。

4. IL-12産生誘導剤が、 $\beta 1,3/1,6$ グルカン構造を有する物質である前項 1 ～ 3 の何れかに記載のガンの治療剤。

5. IL-12産生誘導剤が、 $\beta 1,3/1,6$ グルカン構造を有する茸菌糸体由来成分又は酵母由来成分である前項 4 のガンの治療剤。

6. ガンの化学療法剤及び放射線治療との併用無しに処置される前項 1 ～ 5 の何れかに記載のガンの治療剤。

7. NKT細胞のNKR-P1に選択的に作用してNKT細胞を活性化をおこす物質と併用される前項 1 ～ 6 の何れかに記載のガンの治療剤。

8. 血管新生阻害能を有する物質と併用される前項 1 ～ 7 の何れかに記載のガンの治療剤。

9. NKTP値の投与前値が5.2%以上、もしくはTNF α の投与前値が2500pg/ml以上の測定値を示すことをマーカーとしてチロシンキナーゼ阻害剤とIL-12産生誘導剤の併用治療が行われる前項 1 ～ 8 の何れかに記載のガンの治療剤。

10. 前項 1 ～ 9 の何れかに記載のガン治療剤を用いたガンの治療方法。からなる。

【0011】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳しく説明するが、本明細書中で使用されている技術的および科学的用語は、別途定義されていない限り、本発明の属する技術分野において通常の知識を有する者により普通に理解される意味を持つ。

【0012】

本発明者の医学博士八木田のガン新免疫療法 (NITC) とは 4 つの異なる作用機序を組み合わせることからなる治療手段である。

第一の作用機序は、血管新生阻害物質 (ベターシャーク) を投与してガンへの血流を障害してガン縮小をはかる方法である。これは血管内皮細胞増殖因子 (VE

GF) を測定することでその効果は判定が可能である。血管新生阻害作用はVEGF値のマイナス (負) 値 (-VEGF) で評価できる。このVEGF値の代わりにFGF、HGFなどのその他の血管増殖因子を用いることも血管新生阻害能を評価することが可能である。またVEGFの代わりに血管新生阻害因子の正数値でもその評価が可能である (例えばエンドスタチン値)。

【0013】

第2の作用機序は、 $\beta 1,3$ グルカン構造を担持する化合物を投与してTh1サイトカイン(TNF α 、IFN γ 、IL-12)を誘導してCTLを活性化する方法である。CTL活性はCD8(+)パーフォリン産生能力で判定が可能であるが、このCD8(+)パーフォリン値には細胞障害性T細胞(CTL)と免疫抑制性T細胞(STC; Suppressor T cell)とがあり、前者はガン細胞を障害し、後者の活性化は結果的にガンの増殖につながる。したがってその絶対値では評価はできない。しかし前者はIFN γ が10 IU/ml以上かもしくはIL-12値が7.8 pg/ml以上であればCTLであり、IFN γ とIL-12が低値であればSTCと判定される。そこでCTL活性は、IFN γ 産生能力(IFN γ 値)もしくはIL-12産生能力(IL-12値)で評価が可能である。

【0014】

第三及び第四の作用機序である $\alpha 1,3$ グルカン構造を担持する化合物の投与によって活性化されるeffector細胞はNK細胞とNKT細胞である。このNKとNKT細胞とはNKR-P1(NK細胞受容体CD161(+))を共有しており、前者はCD3(-)CD161(+))の表面マーカーでNK細胞数は測定可能であり、その活性化はCD3(-)CD161(+)パーフォリン産生能力で判定が可能である。一方後者のNKT細胞はCD3(+)CD161(+)でその細胞数は測定が可能となり、そのパーフォリン産生能力(NKTPと記す)でNKT細胞の活性化は測定可能である。

【0015】

したがってガン治療における新免疫療法(NITC)であっても一般的な免疫療法であっても以下の測定項目でそれぞれのeffector細胞もしくは血管新生阻害作用を評価することが可能である。具体的には、CTL活性はIFN γ あるいはIL-12の産生誘導能力で評価が可能である。NK細胞の活性化はCD3(-)CD161(+)もしくはCD

3(-)CD161(+)パーフォリン値でも評価可能である。NKT細胞の活性化はCD3(+)CD161(+)もしくはCD3(+)CD161(+)パーフォリン値 (NKTP値) でも評価が可能である。

【0016】

本発明は、上記の新免疫療法にチロシンキナーゼ阻害剤を併用することによる臨床における結果を検討することにより行われた。本発明者は、新免疫療法 (NITC) として、ガン患者に α 1,3グルカン構造を担持する化合物、 β 1,3グルカン構造を担持する化合物と血管新生阻害作用物質 (サメ軟骨) を併用し、IL-12、 $\text{IFN}\gamma$ 他の各種サイトカインを測定した。なお、CD8 (+) パーフォリン産生は、 $\text{IFN}\gamma$ 及びIL-12の産生とは強い正の相関性が存在し、この結果、CD8 (+) パーフォリン産生の測定はCTL活性ルートの評価に意義を見出している。

【0017】

この意義によりCD8 (+) パーフォリン産生能の測定は、有用なCTL活性化剤 (つまりIL-12産生誘発剤) のスクリーニング方法に適用可能であり、このスクリーニング方法を利用すればCTL活性化能 (IL-12産生誘発能) を担持する新規 β 1,3グルカンの特定が可能である。本発明で使用する、IL-12産生誘導剤は特に限定せず、広く使用可能である。例えば、 β 1,3グルカン構造を持つ茸菌糸体組成物製剤 (例えばILX商品名: 東西医薬研究所、ILY商品名: セイシン企業、AHCC: アミノアップ)、或は β 1,3グルカン構造を持つ各種酵母 (海洋性酵母、パン酵母、NBGTM) が利用できる。また、新規なIL-12産生誘導剤は、CD8パーフォリン産生能の測定を組み合わせることで当業者は容易にIL-12産生誘導剤 (CTL活性化剤) を特定可能である。CTL活性化剤は、本発明で使用するIL-12産生誘導剤と同義である。

【0018】

本発明では、このIL-12産生誘導剤とチロシンキナーゼ阻害剤の併用が必須である。具体例では、ZD1839 (イレッサ商品名) 又はSTI571 (グリベック商品名) を使ったが、各種チロシンキナーゼ阻害剤が有効に利用できる。それらは標的分子として、HER2/neu、HER3、HER4、c-kit、PDGFR、bcr-abl、EGFR等が例示される。最も効果的な分子はEGFR又はc-kitである。

チロシンキナーゼ阻害剤の投与量は、各分子標的化合物の推奨投与量に従うが、10～500mg/日の経口投与がおこなわれる。

【0019】

IL-12産生誘導剤とチロシンキナーゼ阻害剤の併用は、特に限定はされないが、治療初期からでもどちらを先行させていても良い。具体例では、NITC療法特にIL-12産生誘導剤を一定期間投与後に、チロシンキナーゼ阻害剤を併用し、劇的な臨床効果を確認した。

【0020】

本発明では、IL-12産生誘導剤に加えて、NK活性化剤又はNKT活性化剤の併用が可能である。ニゲロオリゴ糖、フコイダン等の α 1,3グルカン構造を持つ化合物の組成物製剤がNK活性化剤又はNKT活性化剤として有用である。 α 1,3グルカン構造を持つ化合物は種々知られており、この既知構造とCD3 (－) CD161 (+)、CD3 (－) CD161 (+) パーフォリン産生能、CD3 (+) CD161 (+)、CD3 (+) CD161 (+) パーフォリン産生能の測定を組み合わせれば当業者は容易にNK活性化剤を特定可能である。なお、CD3 (+) CD161 (+) はNKT細胞の受容体NKR-P1に作用することを意味する。

【0021】

α 1,3グルカン構造の糖類物質としては、例えば、ニゲロオリゴ糖(TSO)、フコイダン、硫酸オリゴ糖等が挙げられる。

ニゲロオリゴ糖は、3-O- α -D-グルコピラノシル-D-グルコースを構成単位として含有する糖類である。代表的なものとしては、ニゲロース、ニゲロシルグルコース、ニゲロシルマルトース等が挙げられる。

【0022】

また、市販されているニゲロオリゴ糖としては、ニゲロオリゴ糖液糖(販売者・武田食品工業株式会社)が挙げられるが、これが含有する主なニゲロオリゴ糖は(1) ニゲロース α -D-Glcp-(1,3)-D-Glc (2) ニゲロシルグルコース α -D-Glcp-(1,3)- α -D-Glcp-(1,4)-D-Glc (3) ニゲロシルマルトース α -D-Glcp-(1,3)- α -D-Glcp-(1,4)- α -D-Glcp-(1,4)-D-Glc (なお、Glcはグルコース、pはピラノースの略号である) である。

フコイダンは、狭義ではフコースの2乃至6分子に硫酸1分子が結合した硫酸化フコース含有多糖類であり、これにキシロースあるいはウロン酸を含有したフコイダン様多糖体を食品レベルで「フコイダン」と称している。フコイダンは、例えばコンブを破碎し、チップ化し、水溶液成分を抽出した後、抽出残渣を遠心分離により除去し、ヨードや塩化ナトリウム等の低分子物質を限外ろ過により除去して凍結乾燥化して製剤化される。

フコイダンとしては、褐藻類由来フコイダン、例えばガゴメコンブ由来のフコイダン、およびオキナワモズク由来フコイダン等が例示される。ガゴメコンブ等の褐藻類コンブ科由来のフコイダンには少なくとも3種類のフコイダン、F-フコイダン (α -L-フコースのポリマー)、U-フコイダン (β -D-グルクロン酸と α -D-マンノースを主鎖とし、側鎖に α -L-フコースをもつ)、G-フコイダン (β -D-ガラクトースを主鎖とし、側鎖に α -L-フコースをもつ)、が存在しており、いずれのフコイダンもフコースが硫酸化されている。

【0023】

硫酸オリゴ糖としては、例えば株式会社白子製のスサビノリ (*Poryphyra Yezaensis*) 由来の抽出物があげられる。該抽出物の主成分は α 1,3結合のガラクトタン硫酸のオリゴ糖と α 1,3結合および β 1,4結合よりなるガラクトタン硫酸のオリゴ糖である。

【0024】

本発明のチロシンキナーゼ阻害剤とCTL活性化剤 (IL-12産生誘導剤、 $\text{INF}\gamma$ 産生誘導剤) との併用、更にはNK活性化剤、NKT活性化剤、新生血管阻害剤との併用は、その適用法を選別することで肺ガン (肺扁平上皮ガン、肺腺ガン、小細胞肺ガン)、胸腺腫、甲状腺ガン、前立腺ガン、腎ガン、膀胱ガン、結腸ガン、直腸ガン、食道ガン、盲腸ガン、尿管ガン、乳ガン、子宮頸ガン、脳ガン、舌ガン、咽頭ガン、鼻腔ガン、喉頭ガン、胃ガン、肝ガン、胆管ガン、精巣ガン、卵巣ガン、子宮体ガン、転移性骨ガン、悪性黒色腫、骨肉腫、悪性リンパ腫、形質細胞腫、脂肪肉腫等の治療に有効である。

【0025】

本発明に係るチロシンキナーゼ阻害剤とCTL活性化剤 (IL-12産生誘導剤、 INF

γ 産生誘導剤) の併用、更にはNK活性化剤、NKT活性化剤、新生血管阻害剤との併用は、その活性化を誘導または増強し、さらに活性化を維持できる処方にて用いられる。すなわち、その活性化を誘導または増強し、さらに活性化を維持できる投与量、ならびに投与期間を選択して用いられる。具体的には、その投与量は、NK活性化剤又はNKT活性化剤である α -1,3グルカン構造を持つ化合物は 1 g ~ 40 g / 日程度、好ましくは 5 g ~ 20 g / 日程度で、CTL活性化剤 (IL-12産生誘導剤、INF γ 産生誘導剤) である β -1,3グルカン構造を持つ化合物は 1 g ~ 10 g / 日程度、好ましくは 3 g ~ 6 g / 日程度である。また、投与期間は一般的には 10 日間 ~ 24 ヶ月間、投与頻度は隔日又は 1 ~ 3 回 / 日で、好ましくは連日投与である。当該CTL活性化剤 (IL-12産生誘導剤、INF γ 産生誘導剤)、NK活性化剤、NKT活性化剤は、好適には経口摂取される。無論、投与量を減少させ、これらを非経口に耐え得る品質に調製することで、非経口摂取 (静脈内または筋肉内投与などを含む) も可能である。

【0026】

抗ガン (化学療法) 剤、放射線、あるいはステロイド併用療法を、本発明の併用に加えて行う場合には、2種類の免疫系のうち、TNF α \rightarrow IFN γ \rightarrow IL-12 \rightarrow キラーT細胞の系統が著しく障害される。そのためこれらは本発明では用いないことが好ましい。但し抗ガン剤を投与するとき、上記の免疫系を障害しない投与方法である低濃度化学療法すなわち 5FU、UFT、ミフロール、フルツロン、CDDP (5 μ g ~ 10 μ g) の低濃度やタキソテールあるいはタキソール、アドリアマイシン、マイトマイシン、CPT-11などの低濃度抗ガン剤の投与法等を適用することは有用である。また同様に放射線療法において低容量照射の適用、ステロイド療法においても低濃度投与等を選択する必要がある。

【0027】

細胞および各サイトカインの測定方法を以下に例示する。

(NKT細胞の測定) (NK細胞の測定) (CD8の測定)

NKR-P1を有するNKT細胞の測定は、NKT細胞の細胞表面に特異的に存在する細胞表面抗原 (CD3およびCD161) の測定により行うことができる。具体的には、末梢血中のリンパ球について、CD3が陽性でかつCD161が陽性 (CD3+CD161+) の細胞

を検定する。つまり、NKT細胞の細胞表面抗原であるCD3およびCD161を、モノクローナル抗体を用いてフローサイトメトリーを使用するTwo Color検査により測定する。ここでNKT細胞が活性化されているとは、リンパ球の中でCD3+CD161+NKT細胞の割合が10%以上、より好ましくは16%以上であることをいう。NKT細胞活性化能とは、NKT細胞の割合を10%以上、より好ましくは16%以上に増加せしめる機能、またはある物質を投与する前のNKT細胞の割合より更に増強せしめる機能を意味する。

同様に (CD3-CD161+) とはCD3が陰性でかつCD161が陽性の細胞を検定することである。この方法はNK細胞の測定に有用である。

さらにCD8+とはCD8が陽性の細胞を検定することである。この方法はCTL活性の測定に有用である。

【0028】

実施例ではガン患者の血液を用いて、血中細胞について細胞表面抗原であるCD3、CD161、CD8について陽性・陰性で区別し、各細胞の割合を、フローサイトメトリーを用いたTwo Color検査により常法通り測定した。このときCD3、CD161、CD8に対するモノクローナル抗体は、それぞれコールター社製製又はベクトンディッキンソン社製ものを使用した。

【0029】

(パーフォリン産生細胞の測定)

末梢血中のリンパ球について、細胞表面抗原であるCD3、CD161、CD8のうち2者とパーフォリンについてフローサイトメトリーを用いたThree Color検査により常法通り測定する。具体的には、採取した血液に固定液を加えて細胞を固定し、膜透過液を添加後抗パーフォリン抗体 (Pharmingen社製) を添加して反応させ、さらにPRE-Cy5標識二次抗体 (DAKO社性) を添加して反応させ、ついで抗CD3-PE (Coulter 6604627) 抗体および抗CD161-FITC (B-D) 抗体を添加して反応させ、その後フローサイトメトリーで測定する。図・表中での略語はPERと表示した。

【0030】

(サイトカインを測定するための試料の調製)

まず、血液より単核球画分を分離調製する。ヘパリン加末梢血をリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate Buffered Saline) (PBS) で2倍に希釈して混和した後、Ficoll-Conray液 (比重1.077) 上に重層し、400Gで20分間遠沈後、単核球画分を採取する。洗浄後、10%牛胎児血清 (FBS) を加えたRPMI-1640培地を加え、細胞数を 1×10^6 個となるように調製する。得られた細胞浮遊液200 μ lにフィトヘマグルチニン (Phytohemagglutinin) (DIFCO社製) を20 μ g/mlの濃度となるように加え、96穴マイクロプレートにて5%CO₂存在下、37℃で24時間培養し、該培養した細胞溶液中のサイトカインを測定する試料とする。

【0031】

(IL-12の測定)

IL-12量の測定は自体公知の臨床、生化学的検査を利用できるが、R&D SYSTEMS社やMBL社より入手することのできる酵素免疫測定法 (ELISA) による測定キットが使用される。ここではR&D SYSTEMS社の測定キットを用いた。実際には96穴マイクロプレートの各穴に測定用希釈液Assay Diluent RD1Fを50 μ l、標準液 (standard) または前記サイトカイン測定用試料の調製法で調製した試料を200 μ lずつ分注した後、室温にて静置して2時間反応させた。その後、西洋わさびパーオキシダーゼ (horse radish peroxidase) (HRP) 標識抗IL-12抗体を200 μ lずつ分注し2時間室温で静置した。各穴の反応液を除去し3回洗浄後、発色基質溶液を200 μ lずつ分注し、20分間室温静置後、酵素反応停止溶液を50 μ lずつ分注した。550nmを対照として450nmにおける各穴の吸光度をE max (和光純薬株式会社製) にて測定した。IL-12量は、pg/mlとして表される。ここでIL-12産生誘発能とは、末梢血単核球画分が刺激により産生するIL-12量を、7.8pg/ml以上に増強せしめる機能、またはある物質を投与する前のIL-12産生量より増強せしめる機能を意味する。

【0032】

(IFN γ の測定)

IFN γ の測定は、BioSource Europe S.社のIFN γ EASIAキットを用いて、酵素免疫測定法 (EIA法) で測定した。実際には96穴マイクロプレートの

各穴に標準液 (standard) または上記調製した試料を 2 倍希釈したものを $50 \mu\text{l}$ ずつ分注し、HRP 標識抗 IFN- γ 抗体を $50 \mu\text{l}$ ずつ分注し更に振盪しながら 2 時間室温で反応させた。各穴の反応液を除去し 3 回洗浄後、発色基質溶液を $200 \mu\text{l}$ ずつ分注し、振盪しながら 15 分間室温で反応させ、酵素反応停止溶液を $50 \mu\text{l}$ ずつ分注した。630 nm を対照として 450 nm および 490 nm における各穴の吸光度を Emax (和光純薬株式会社製) にて測定した。IFN γ 量は、IU/ml として表される。

【0033】

(血管新生阻害能の測定)

(血管内皮細胞増殖因子/VEGF と塩基性繊維芽細胞増殖因子/bFGF 及び血管新生阻害因子エンドスタチン/endostatin の測定)

市販キットの各酵素免疫固相法 (ELISA: enzyme linked immuno sorbent assay) (ACCUCYTE Human VEGF, ACCUCYTE Human bFGF, ACCUCYTE Human Endostatin: CYTIMMUNE Sciences Inc.) で血清中濃度を測定した。

【0034】

なお、臨床検査に用いた各マーカーは何れも市販品を用い、各推奨の方法により測定値を示した。表示される略字は各一般的な表示方法によった。

【0035】

患者の効果判定は、次の CR (完全寛解)、PR (部分寛解)、LNC (長期不変)、SNC (短期不変)、PD (病状進行) の 5 段階判定を行った。また、各癌種での奏効率とは、各癌種の全症例中の CR、PR、LNC、SNC、PD の割合を示す (例、症例数 7 の結腸癌における、PR 71.4% とは 7 症例中の内 5 症例が PR を表す)。

【0036】

【実施例】

以下に、実施例を用いて本発明を具体的に説明するが、本発明は本実施例に限定されるものではない。

新免疫療法 (NITC) として進行末期癌症例に対し治療を行ってきた。2002 年 4 月末現在 3490 例中 35.3% の CR、PR の奏効例を得ている。この NITC は β -1,3 グルカンの投与で内因性 TNF α 、IFN γ 、IL-12 を誘導して CTL (キラー T 細胞) を活性化

し、かつ α -1,3グルカンの投与でNKおよびNKT細胞の活性化をはかると共にベターシャークの経口投与で血管新生阻害をはかるBRM療法である。患者には、IL-12産生誘発剤、さめ軟骨（セイシン企業）、及び α 1,3構造をもつ糖類等を、各推奨処方により投与された。また、IL-12産生誘導剤として、ILX（東西医薬）、ILY（セイシン企業）、クレスチン（三共）、イミュトール（NBG）等を患者の症状により、単独又は併用して投与がなされ、略同一の結果を得た。

【0037】

【実施例1】

症例①

今回、末期肺腺癌（両肺粟粒性肺転移）で頸椎、胸椎および股関節の骨転移かつ脳転移も認められた症例（NITC PD例）にイレッサ250mg/日の経口投与を追加したところ1ヶ月半で癌性胸水と原発性肺癌が完全に消失かつ右股関節・頸椎・胸椎の骨転移も治癒し、TNF α 、IFN γ 、及びIL-12も基準値を超えて活性化され、各種腫瘍マーカーも正常化しCRと判定された。（図-1）（表-1）

【0038】

【表1】

症例① 両肺粟粒性肺転移

NS 39y.o. Male 肺腺Ca. 頸椎・胸椎・右股関節転移、脳転移
初診 2001/10/30

初診	2001/10/30	2001/11/28	2001/12/26	2002/1/22	2002/2/20	2002/3/20	2002/4/16	2002/5/15	2002/6/12	2002/8/7	2002/9/4	2002/9/18
受付日	2001/10/30	2001/11/28	2001/12/26	2002/1/22	2002/2/20	2002/3/20	2002/4/16	2002/5/15	2002/6/12	2002/8/7	2002/9/4	2002/9/18
治療期間(月)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
有効性		NC	NC	PD	PD	PD	PD	PD	NC	PR	PR	CR
CD3+CD3- CD16 1+(16 %)	9.8	7.1	6.1	8.1		9.5				12.5	13.4	
CD8+ PER+ (14%)	26.4		13.6	14.7		15.6				23.8		
TH1/ TH2(CD4)	14.9		14.7	15.90		16.6				40.7	47.2	
TNF α (1000 pg/ml)	42			1590		87				99	2003	
IFN γ (10 IU/ml)	2.4			26.1		1.6				0.4	32.4	
IL-12 (7.8p g/ml)	7.8>			22.8		7.8>				7.8>	23.6	
IL-10 (pg/ ml)	100			167		123				37	73	
VEGF (pg/ ml)	1060			642		1190		1600	602	625	362	
CEA(5.0ng /ml)	35.3			81.1		749		864	1100	1080	309	4.5
CA19- 9 (37U/ ml)				800		17000		15000	21000	9500	1400	32
SPA N-1 (30U /ml)	340			2400		2900		4500	2900	2000	390	16
NCC -ST- 439 (7.0U /ml)				29		490		620	940	1100	190	6.7
CA15- 3 (30U /ml)	35			11		240		620	940	1100	40	26
BCA2 25 (160 U/ml)						7900		15000	21000	9500	1400	
シリン LEX- 1 (38U /ml)	160	130	98	140	170	430	1300	1300	1600	1900	440	36
1CTP (4.5n g/ml)	4.3	3.1	4.6	5.2	4.7	6.2	6.2	6.8	9.4	15.9	13.9	
抗72 レ7-2 レ7- 2- (220- 530U /ml)	898	898		609	546	674	1060	1010	659	564	626	

2002/7/23
イレッサ
投与開始

【0039】

症例②

前立腺癌で多発骨転移の症例でホルモン抵抗性、抗癌剤抵抗性、免疫療法抵抗

性の末期癌症例にZA1839（イレッサ）250mg/日をNITCに併用追加投与したが1ヶ月で多発骨転移も完全寛解しPSAの値も170mg/mlから4.0ng/mlと正常化した。（CR判定）（表-2）

【表2】

症例② KH 53y.o. Male 前立腺 多発骨転移

初診 1997/5/24

受付日	治療期間(月)	有効性	CD3+ CD16 1+(16%)	CD3- CD16 1+(11%)	CD 8+P ER+ (14%)	TH1/ TH2 (7以上)	TNF α (1000 pg/ml)	IFNγ (10 IU/ml)	IL- 12 (7.8pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	VEG F(pg/ml)	DU PA N-2 (150U/ml)	CAI 9-9 (37U/ml)	CA 72- コウ 4 (4.0U/ml)	STN E(RI A) (10ng/ml)	NS P (75ng/ml)	BF P (4.0ng/ml)	PA IA (4.0ng/ml)	IC P (4.5ng/ml)	IL-2レ ン (220-530U/ml)	
2000/4/5	35PD		10.9			1.8	1430	19.2	11.6	139							1	6.9	1.2	2.1	579
2000/4/22	35PD											25>	55	32.30>	36		1.4	7.2	1.7	2.7	636
2000/6/17	37PD		18.4	10		2	1380	25	7.8>	492			46				1.2	11	3	2.4	626
2000/8/12	39PD												73				1.1	27	5.4	5.4	
2000/9/9	40PR		17.8	7.7		2.4	1670	38.8	8	673							0.9	16	3.3	3.6	
2000/11/17	42PR												44				1.2	14	2.5	2.5	
2001/1/5	44NC										633	37	63	29.30>	28	5.5	42			1.8	
2001/1/26	45PD		20.6	11.8		1.6	3070	44.2	12	309	676		58				1	22	5.6	2.7	
2001/3/23	47PD										792		55				0.8	28	4.2	3.1	708
2001/4/20	48NC		20.2	10.9		1.7	1160	17.3	12.8	125	565	48	61	31	5.1	32	5.3	47	1.3	2.6	560
2001/6/15	49NC										548		52				1.4	27	5.6	2.3	630
2001/7/14	50PD		14.7	6.9	8.4	2	3310	39.7	14.8	215	523		68				1.4	34	6.4	2.5	680
2001/9/14	52NC		9.5	6.2	9	1.8	4040	62.7	28	311	638						0.8	38	5.2	1.9	662
2001/10/20	54NC										731	94	53				1.6	32	4.7	2.9	593
2001/12/15	56NC		13.4	9.7	9.7	1.7	3360	66	54.2	305	575		55				1.3	33	6.8	3	558
2002/1/12	56NC										594	86	66				1.5	33	5.3	2.2	542
2002/3/16	59PD		12.8	14.8	11	1.6	2340	70.2	49	43	878		84				2	85	13	6.1	648
2002/5/25	61PD										784		35				1.9	100	11	5.8	693
2002/6/14	62PD		11	13.2	7.2	2.7	6610	104	97.7	175	600						3.4	95	14	6.5	644
2002/7/12	63PD										708		35				3.9	110	20	5.8	
2002/8/10	63PD										582						4	170	26	4.7	
2002/8/31	64PR		16.2	6.6	2.1	1.6	2540	35.7	47.8	183	562		30				4	140	20	5.2	688
2002/9/14	65CR		17.0	12.3	7.2	2.7	3420	48.2	72.4	154	342		27				1.4	4.0	4.0	2.5	342

2002/8/17
イレッサ
投与開始

2002/8/17
イレッサ
投与開始

【0040】

症例③

右肺腺癌で両肺に粟粒性肺転移と多発肋骨転移が認められ、呼吸困難と激しい背部痛が出現していた症例に2002年8月3日よりイレッサ1錠250mg/日をNITCに併

用連日投与した。

8月31日の投与後約1ヶ月で右肺原発巣は半減し粟粒性肺転移もほとんど消失し、多発肋骨転移も消失した。TNF α 、IFN γ 、及びIL-12産生誘導も増加し、腫瘍マーカーのCEAが治療前256ng/mlから172ng/mlと、またSLX-1が480U/mlから140U/mlと半減以下となった。(PR判定) (図-2) (表-3)

【表 3】

症例③ 両肺粟粒性肺転移

TH 62y.o. Female 肺(腺)Ca. 肋骨転移
初診 2001/11/16

受付日	治療 期間 (月)	有効 性	CD3+ CD16 1+(16 %)	CD3- CD16 1+ (11%)	CD8+ PER+ (14%)	TH1/ TH2(C D4)比 (以上)	TNF α (1000 pg/ml)	IFN γ (10 IU/ml)	IL-12 (7.8pg /ml)	IL-10 (pg/m l)	VEGF (pg/m l)	CEA 5.0ng /ml)	シアル 酸 LEX- 1 (38U/ ml)
2001/11/16	0		9.5	19.2	5.8	5.4	1180	14.5	19.5	305	215	53.3	280
2001/12/8	1	PD									248	60.3	280
2002/1/5	2	PD	6.6	21.4	6.6	5.4	1870	17.7	21.1	139	234	72.9	290
2002/2/2	3	PD									206	88.9	280
2002/3/2	4	PD										133	350
2002/3/23	4	NC									261	141	430
2002/4/13	5	PD	7.5	22.7	3.8	4.2	1440	16.3	7.8	284	151	175	410
2002/5/11	6	PD									282	210	400
2002/6/8	7	PD									336	245	460
2002/7/6	8	NC	5.7	30	4.4	5.1	2810	19.9	12.8	454	269	256	480
2002/8/31	10	PR	8	27.2	4.1	5.3	1680	16.4	45.4	111	248	172	140

2002/8/3
イレッサ
投与開始

【0041】

NITCと抗癌剤、放射線との併用は、IFN γ 、IL-12の産生誘導を阻害するが、NITCとイレッサの併用はIFN γ 、IL-12の産生を抑制せずかえって増加させる傾向が認められた。Th1サイトカインの産生は骨転移を改善するために重要であり、破

骨細胞分化増殖に対しTRAF6を阻害することで阻害作用が認められている。またイレッサはTRAF6の下流のc-fos mRNAのシグナル伝達を阻害することで破骨細胞の分化増殖を阻害することが可能である。(図-3)

【0042】

イレッサは、c-fos mRNAの発現を抑制してEGFRのチロシンキナーゼシグナル伝達系を抑制すると共に破骨細胞の分化を阻害する。また、新免疫療法(NITC)によりIFN γ やIL-12等のTh1サイトカインを増量することで破骨細胞の分化をc-fosより上流で阻害し、イレッサとNITCとは相加あるいは相乗的に骨転移を改善することが可能となる。骨転移に関してはNITCによりTh1サイトカインの産生増強により破骨細胞の分化におけるTRAF6の産生を抑制し、さらにイレッサによるTRAF6の下流にあるc-fos mRNAの発現を抑制して2重システムで骨転移を阻害する。従って、骨転移に対してもNITCとイレッサは相加あるいは相乗的に作用し症例①、症例②および症例③の骨転移を改善したものと考えられる。

【0043】

イレッサは癌細胞に直接的あるいは間接的に抗腫瘍性を作用するのに対し、NITCは β -1,3グルカン投与でTh1サイトカイン(TNF α 、IFN γ 、IL-12)を産生増強し、CTLのみならずNKやNKT細胞も活性化する。一方、 α -1,3グルカン投与でNKとNKT細胞を活性化し、effector細胞を活性化する。また、NITCはADCC活性化も促進することが分っている。すなわち、イレッサの分子標的治療と免疫療法とは相互に補いながら癌の治療効果を亢める作用が認められた。

【0044】

イレッサによる治療では、EGFRチロシンキナーゼ阻害により癌細胞の縮小(PR)(約20%)と増殖の停止(NC)(約50%)の成績である。NITCを併用することで β -1,3グルカンでTh1サイトカイン \rightarrow CTL活性を促し、 α -1,3グルカンでNKおよびNKT細胞を活性化することによりそれぞれのeffector細胞を増殖、活性化することが可能である。これらの活性化CTL、NKおよびNKT細胞がイレッサで発育、増殖の減速あるいは停止状態におちいった腫瘍細胞を攻撃しやすくなることによるものと考えられる。従って人類がこれまで治療不能と考えられた粟粒性肺転移や骨転移など難治性悪性腫瘍も治療可能となる。

【実施例 2】

【0045】

症例④ 73歳 男性

2000年8月10日に小腸平滑筋肉腫で小腸切除し、2001年12月27日に肝転移で肝動脈塞栓術を施行し経度に縮小をみた。その後、2002年7月肝転移が増大し、腹膜転移も出現した。そのため、2002年7月22日より、NITC治療を開始した。2002年8月20日より、グリベック400mg/日の投与も開始した。8月20日時点での、TH1サイトカインの活性化は起こっており、各TNF α (2570pg/ml)、IFN γ (17.5IU/ml)、IL-12(49.8pg/ml)であった。NK活性も強い値 [CD3(-)CD161(+): 30.6%] を示した。しかし、NKT細胞活性はみとめられなかった [CD3(+)CD161(+)perforin(+): 29.9%]。腫瘍マーカーはGATは22.9u/ml (正常値13.6以下)、BFP: 93ng/ml (正常値75以下)、ICTP: 5.2ng/ml (正常値4.5以下) と高値を示した。約1ヶ月間、NITCとグリベックの併用療法を続け、2002年9月18日に測定した各免疫マーカーの値は前回よりも増強していた。各TNF α (4322pg/ml)、IFN γ (34.8IU/ml)、IL-12(98.3pg/ml)、NK活性 [CD3(-)CD161(+): 35.4%]、NKT細胞活性 [CD3(+)CD161(+)perforin(+): 32.4%]。腫瘍マーカーはGATは18.3u/ml (正常値13.6以下)、BFP: 79ng/ml (正常値75以下)、ICTP: 4.8ng/ml (正常値4.5以下) であった。そして、驚いたことに、同時に行った超音波検査で肝転移は50%以上縮小し、異常を示した腫瘍マーカーも全て改善していた。

【0046】

症例⑤ 62歳 女性 子宮筋肉腫

2000年1月26日に子宮筋肉腫で子宮全摘出と両側付属器官の切除を受けた。しかし、腹腔内残存腫瘍が認められた。2000年2月から5月まで、パラプラチン、エンドキサン、テラルビシンの抗癌剤投与を受けたがPDと判定された。2001年11月15日に左腹部腹壁に手拳大の腫瘍が出現し、2002年1月23日再切除を施行した。その後、2002年2月から4月までイホマイドの抗癌剤投与したが2002年4月に右腹壁に6 x 5 cm大の子宮筋肉腫の再々転移が認められた。2002年8月10日に超音波検査で右腹壁に103 x 88 x 81mmと左腹壁に29 x 30 x 27mmの肉腫の増大が認められた。

2002年8月10日より、グリベック400mg/日とNITCの併用療法を行った。2002年9月17日の超音波検査で右腹壁の腫瘍58 x 40 x 39mmと左腹壁の腫瘍15 x 14 x 13mmと半減していた。また、TH1サイトカインの産生能力の増強が確認された (TNF α (4106pg/ml)、IFN γ (33.5IU/ml)、IL-12(80.6pg/ml))。

【0047】

症例④、症例⑤はいずれも末期肉腫である。これらの症例では、NITC単独ではPDであったが、グリベック併用で約1ヶ月の極めて短い期間でいずれも著大な改善 (PR)を得た。これまでのグリベックの投与報告例では4ヶ月から6ヶ月の投与で20%前後の奏効例しか報告されていない。しかし、本臨床例では、極めて短期間に処方例全てでPRを達成した。このことは、NITC療法特にIL-12の産生誘発療法とグリベックの併用療法は、上記イレッサのNITC療法特にIL-12の産生誘発療法との併用療法と同様に、対癌治療に対して相乗効果が発揮されたものと推定された。かくして、本発明により、チロシンキナーゼ阻害剤とTH1サイトカイン産生増強剤の併用には、対抗癌効果に相乗効果のあることを確認した。なお、抗癌剤とNITCの併用療法ではTH1サイトカイン値の著大な抑制が認められたが、本発明のチロシンキナーゼ阻害剤とNITCの併用療法ではいずれも免疫能力を上昇させ、そして抗腫瘍作用においても相乗的に作用することが確認された。

【0048】

【実施例3】

NITCとイレッサとの併用治療における、癌の免疫治療の実施例1、2の症例①～⑤症例を含む55症例での治療結果を総括した。55症例の癌の進行度は、初期段階から進行末期段階であり、癌種類は肺癌、大腸癌、肛門癌、腎癌、舌癌、乳癌、胃癌、前立腺癌、食道癌、膵癌、咽頭癌、耳下腺癌、膀胱癌、子宮頸癌、卵巣癌である。また、各症例のNITCとイレッサとの併用治療期間は、約2～4ヶ月間である。また、各症例での、患者には、実施例1と同様に、IL-12産生誘導剤、さめ軟骨 (セイシン企業)、及び α 1,3構造をもつ糖類 (NK、NKT活性化剤)が、各推奨処方により投与された。また、イレッサは、各推奨処方に従い、例えば、症例①のように、250mg/日の量を経口投与した。

【0049】

各癌種での奏効率の検討

肺（腺）癌は15例中PR症例が12例の80%に奏効例が認められた。残り3例はNC症例であった。肺（腺）癌症例では4例が粟粒性肺転移症例である。すなわち肺（腺）癌のなかでも粟粒性肺転移は最も予後が不良で呼吸困難を合併し、従来の治療法では全くといってよいほどに改善することは不可能であった。このような粟粒性肺転移症例はイレッサ単独では改善することはあり得ないと考えられる。また肺（腺）癌のイレッサ単独治療例はこれまで奏効例の割合は20%前後と報告されているが、今回のNITCとイレッサとの併用は15例中12例である80%がPR例という驚くべき改善率を示した（図4）。

【0050】

大腸癌は直腸癌と結腸癌とに分類される。一般に直腸癌は結腸癌に比較し、予後不良と考えられている。NITCとイレッサとの併用治療による効果は、直腸癌は4例でいずれもPRと判定され奏効率100%であった。一方、結腸癌は7例でPRが5例（71.4%）、NCが1例（14.3%）、そしてPDが1例（14.3%）であった。従って大腸癌としてはPRが9例（81.8%）という驚くべき改善率を示した（図5）。

【0051】

NITCとイレッサとの併用治療による効果において、肺（腺）、大腸癌以外の癌種で、PR症例が認められた悪性腫瘍は、肛門癌2例中1例の50%、腎癌2例中2例の100%、舌癌は1例中1例の100%、卵巣癌が4例中2例の50%であり、胃癌が3例中1例の33.3%、乳癌は6例中1例の16.7%であった。また、前立腺癌は2例中2例がNCであり、腫瘍マーカーのPSAは低下しなかったが骨転移の疼痛は著明に改善した。食道癌は3例中2例の66.7%がNC、脾癌、喉頭癌、耳下腺癌の各1例はNCで進行が停止していた。膀胱癌と子宮頸癌ではいずれもPD症例のみであった。

【0052】

NITCとイレッサとの併用治療による効果において、肺（腺）癌、大腸癌（結腸癌、直腸癌）、腎癌、舌癌、卵巣癌、胃癌、肛門癌、乳癌の有効例ではTh1サイトカインのTNF α 、IFN γ およびIL-12が高値を示す傾向が認められた。また、VEGFも抑制している傾向が認められた。一方、NK細胞とNKT細胞においては有効例と無効例とで差は認められなかった。従ってイレッサ商品名と免疫療法の併用治療

はTh1サイトカインのなかでもIFN γ とIL-12とを上昇させ得ることがこのような著効例を見出しているものと考えられる(図6)。

【0053】

現在、イレッサ商品名と抗癌剤との併用ではその効果が認められていないが、本発明に係るNITC(特にIL-12産生誘導剤)とイレッサとの併用治療では、各癌種での治療効果を確認できた。特に、肺(腺)癌、大腸癌(結腸癌、直腸癌)、腎癌、舌癌、卵巣癌、胃癌、肛門癌、乳癌種に対してのNITC(特にIL-12産生誘導剤)とイレッサ商品名との併用治療は有効である。

【0054】

以上より、ガン患者に本発明に係るNITC(特にIL-12産生誘導剤)とイレッサRとの併用治療を施すことは、有効なガンの治療方法となる。

【0055】

【実施例4】

免疫療法(NITC)の単独症例の46例(CR:1例、PR:13例、LNC:2例、SNC:22例、PD:8例)および免疫療法(NITC)とイレッサ(250mg/日/経口)追加併用例の27例(CR:2例、PR:20例、NC:5例、PD:0例)の合計73例において、イレッサ投与の寄与度と各免疫学的因子のそれぞれにおける寄与度(率)を検討した。結果は、ロジスティック回帰係数によって図7に示した。

肺腺癌の治療において全体で検討すると、第一はイレッサを投与するか否かが最も重要である。第二が、IL-12の産生能力とNKT細胞でのパーフォリン産生細胞(NKTPと記載)がほぼ同率で重要である。ついでIFN γ 、TNF α の産生能力の順で意義があった。

【0056】

免疫療法(NITC)とイレッサ投与症例の28例における、免疫学的各ファクターの寄与率を検討した。結果は、ロジスティック回帰係数によって図8に示した。その結果、NKTP細胞が最も重要な意義を示した。また、Th1サイトカインのIL-12産生能力、TNF α とIFN γ とのそれぞれの産生能力もまた重要な意義を有することが判明した。この結果から、イレッサ投与初期における患者の免疫能力の差違で本療法での有効群と無効群での識別が可能か否かを判定することは肺腺癌患者の治

療方針決定にとって重要なことと考えられた。

そこで、まずイレッサ投与前のNKTP細胞数を確認し、結果を図9に示した。NKTP細胞数を5.2%でカットオフ値とした場合、無効群の6例全員が5.2%以下であり、有効群の9例も含まれていた。

この2群間で、IL-12とIFN γ の産生能力でその意義を比較検討したが、2群間に差(識別)は確認できなかった。しかし、TNF α 産生能力値で2500pg/mlのカットオフ値で比較すると、有効例の6例が75%で無効群の1例が25%であることが確認でき、図10に示した。

【0057】

以上の結果をまとめると、NKTP値が5.2%以上であればイレッサ、NITCで有効性が高く、それ以下でも、TNF α 値が2500pg/ml以上であれば有効性が期待できる可能性が高いことが示唆された。かくして本実施例の分析結果から、NITCとイレッサ併用投与症例において、NKTP値の投与前値が5.2%以上、もしくはTNF α の投与前値が2500pg/ml以上であれば、NITCとイレッサ併用投与による有効例が有意に高いと判定される($p < 0.05$) (図11) ことが判明した。

【0058】

【実施例5】

実施例4の臨床例によって、免疫療法(NITC)とイレッサとの併用療法のさらなる有用性を分析した。分析結果は図12に示した如く、有効群(CRまたはPR)が一度は有効例となっても再燃、再発するB type と、完全寛解となるA type とに分かれることが判明した。

現在までの症例ではA typeが6例、B typeが5例で判明した。この2種類の型において宿主の免疫学的特徴を検討した結果(図13～14)、以下のように要約される。

【0059】

- 1) IFN γ の産生能力は、A型がB型に対し投与後で有意に高く($p < 0.01$)、かつその変化量にも有意な差が認められた($p < 0.01$)。
- 2) IL-12の産生能力も、A型がB型に対し投与後で有意に高く($p < 0.05$)、かつその変化量にも有意な差が認められた($p < 0.05$)。

3) 血管内皮細胞増生因子 (VEGF) も、A型がB型に対し有意の変化率を示した ($p < 0.05$)。

4) Th1/Th2比及びTh1値では、差が認められなかったが、A型がB型に比べTh2値が治療前でも有意に高値を示し ($p < 0.001$)、投与後においても有意に高値を示した ($p < 0.01$)。また、変化量でも同様に有意な差が認められた ($p < 0.05$)。

。

5) IL-10においても、A型はB型と比較して投与後で有意に高値を示した ($p < 0.05$)。

【0060】

以上の分析結果をもとに、イレッサとNITCとの抗腫瘍作用の相違を図15のシェーマに示した。

癌細胞の増殖が著明な場合は抗原も提示されていない。癌細胞は増殖が激しい細胞ほどEGFRが多いはずである。このEGFRのシグナル伝達系のチロシンキナーゼ阻害作用でイレッサが細胞内でシグナルをブロックする。このことによって癌細胞の核がアポトーシスにおちいり、核の障害が起こり癌細胞の表面にFAS抗原や癌抗原のClassIまたはClassII抗原が表出する。その結果CTL細胞 (キラーT細胞) やNK細胞が抗原認識し免疫細胞が癌細胞をターゲットとして攻撃しアポトーシス小体となった癌細胞を貪食することになる。

従って図15に示した如くイレッサとNITCの併用療法では、まずイレッサが癌細胞での増殖を促すEGFRのシグナル伝達をブロックする。その後、免疫細胞が活性化して癌を攻撃するという時間差があると考えられる。

イレッサが作用するか否かはNKTパーフォリン活性とTh1サイトカインが重要である。また、腫瘍が一時縮小し、その効果が続くか否かはIFN γ とIL-12の産生が投与後も持続することが重要である。またその際にTh2系の免疫系とIL-10の刺激が必要となるものと推定される。さらにVEGFを下げることも重要である。

【発明の効果】

以上の実施例によれば、チロシンキナーゼ阻害剤とIL-12産生誘導剤 (Th1サイトカイン産生増強) の併用はガンの治療において相乗効果あることが見出され、ガン治療における画期的な成果を達成した。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 患者レントゲン図である。

【図 2】 患者レントゲン図である

【図 3】 破骨細胞分化の必須シグナルを図式化した。

【図 4】 肺（腺）癌の奏効例

【図 5】 大腸癌の奏効例

【図 6】 各種癌での奏効例

【図 7】 ロジスティック回帰係数分析による各マーカーの奏効に対する寄与度（肺腺ガン）

【図 8】 イレッサ投与患者におけるロジスティック回帰係数分析による各マーカーの奏効に対する寄与度（肺腺ガン）。

【図 9】 イレッサ投与患者（肺腺ガン）における奏効とイレッサ投与前のNKTP値の関係

【図 10】 イレッサ投与患者（肺腺ガン）における奏効とイレッサ投与前のTNF α 値の関係

【図 11】 イレッサ投与患者（肺腺ガン）における奏効とイレッサ投与前のNKTP値及びTNF α 値の関係

【図 12】 イレッサ投与患者（肺腺ガン）における効果持続による分類

【図 13】 イレッサ投与患者（肺腺ガン）における効果持続による分類によって分けられたA群及びB群についての各種マーカー測定値

【図 14】 イレッサ投与患者（肺腺ガン）における効果持続による分類によって分けられたA群及びB群についての各種マーカー測定値

【図 15】 イレッサとNITCとの抗腫瘍作用における相乗作用機序仮説

【書類名】 図面

【図 1】

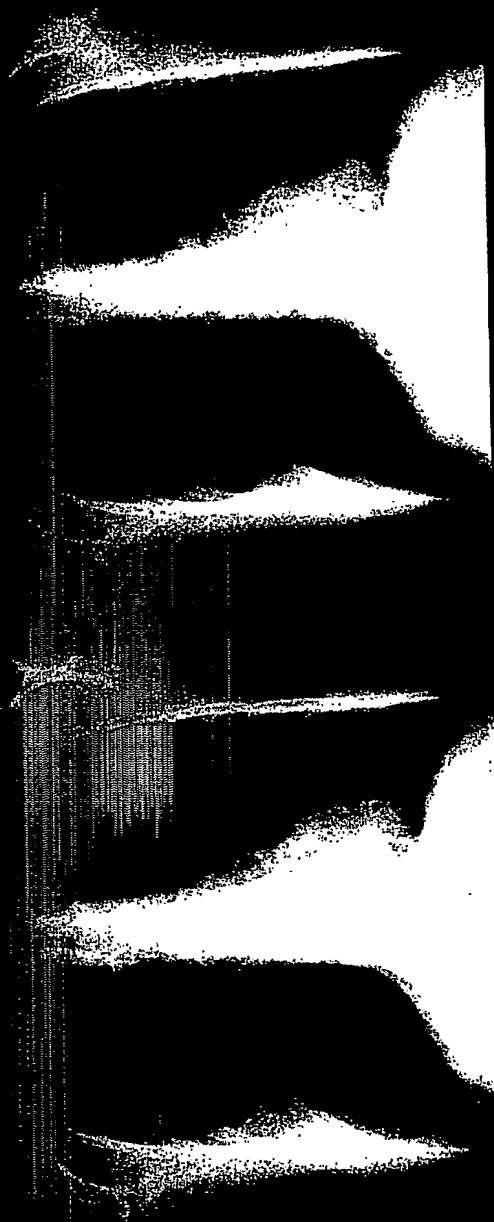


【図2】

肺(腺)Ca. 骨meta

T.H. 61y.o. F

2002.8.3よりイレッサ投与開始

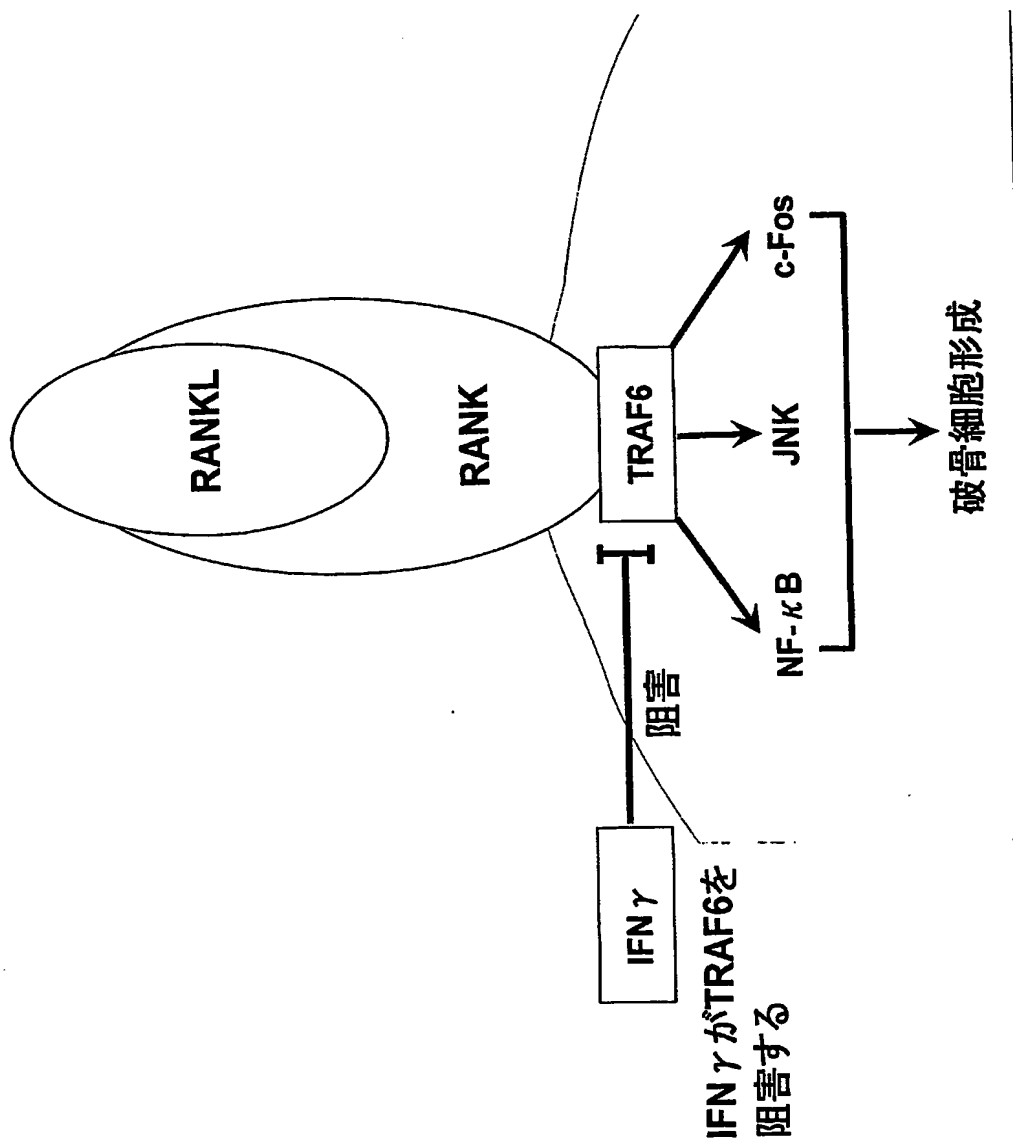


2002.8.31

2002.6.8

【図3】

破骨細胞分化の必須シグナル



【図 4】

肺腺癌の奏効例(イレッサとNITCの併用療法)

	年齢	性別	転移巣	評価
1	T.H. 61	F	肋骨	PR
2	N.S. 39	M	脳、頸椎、胸椎	PR
3	H.T. 78	M		PR~CR
4	F.T. 66	F		PR
5	M.F. 51	F		PR
6	C.I. 59	M	両肺、骨(多発)	PR
7	S.Y. 69	M		PR
8	K.F. 71	F	骨(多発)	PR
9	K.M. 74	F		PR
10	T.S. 66	F		PR
11	O.K. 69	F		PR
12	U.S. 79	F	肺内	PR
13	I.Y. 71	M	骨(多発)	NC~PR
14	I.Y. 73	M		NC~PR
15	O.K. 57	F		NC

肺腺癌の奏効率 : PR 12/15(80.0%)
: NC 3/15(20.0%)

大腸癌の奏効例(イレッサとNITCの併用療法)

結腸癌

	年齢	性別	部位	転移巣	評価
1	K.Y. 57	F	C		PR
2	S.I. 63	F	S	頸部リンパ節	PR
3	M.K. 53	M	A	頸部リンパ節、肺	PR
4	H.M. 51	M	D	肝	PR
5	H.S. 64	F	S	肝、骨	PR
6	S.N. 67	F	T	肺	NC
7	O.T. 63	M	S+C	肺、肝	PD

直腸癌

	年齢	性別	転移巣	評価
1	Y.Y. 57	M	肝	PR
2	O.T. 64	M	(直腸+A)	PR
3	K.H. 60	M		PR
4	K.M. 64	F	肺、肝	PR

結腸癌の奏効率 : PR 5/7(71.4%)
 : NC 1/7(14.3%)
 : PD 1/7(14.3%)

直腸癌の奏効率 : PR 4/4(100%)

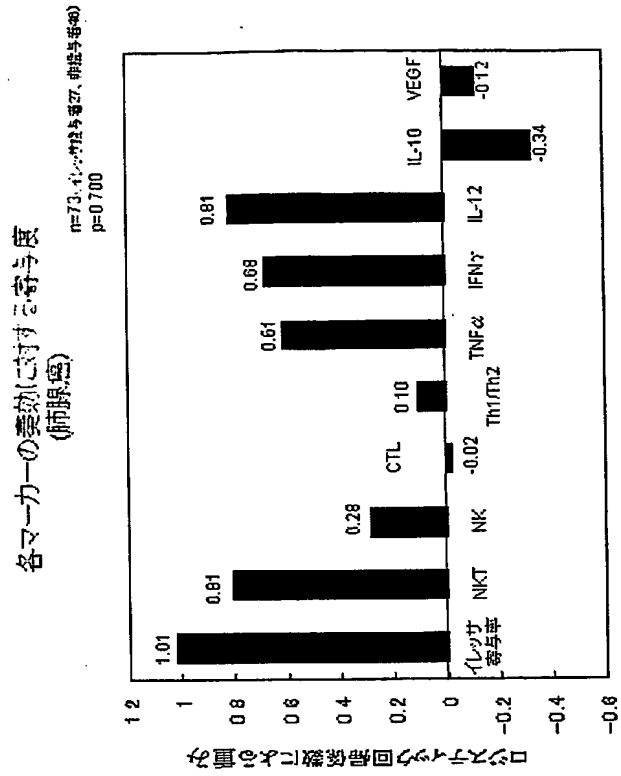
大腸癌の奏効率 : PR 9/11(81.8%)
 : NC 1/11(9.1%)
 : PD 1/11(9.1%)

【図6】

イレッサとNITC併用治療方法の奏効例

	PR	NC	PD	合計n数
肺(腺)癌	12(80.0%)	3(20.0%)	0(0%)	15
大腸癌	9(81.8%)	1(9.1%)	1(9.1%)	11
結腸癌	5(71.4%)	1(14.3%)	1(14.3%)	7
直腸癌	4(100%)			4
肛門癌	1(50%)		1(50%)	2
腎癌	2(100%)			2
舌癌	1(100%)			1
乳癌	1(16.7%)	1(16.7%)	4(66.7%)	6
胃癌	1(33.3%)		2(66.7%)	3
前立腺癌		2(100%)		2
食道癌		2(66.7%)	1(33.3%)	3
膀胱癌		1(100%)		1
喉頭癌		1(100%)		1
耳下腺癌		1(100%)		1
膀胱癌			2(100%)	2
子宮頸癌			1(100%)	1
卵巣	2(50.0%)	1(25.0%)	1(25.0%)	4
合計	29(52.7%)	13(23.6%)	13(23.6%)	55

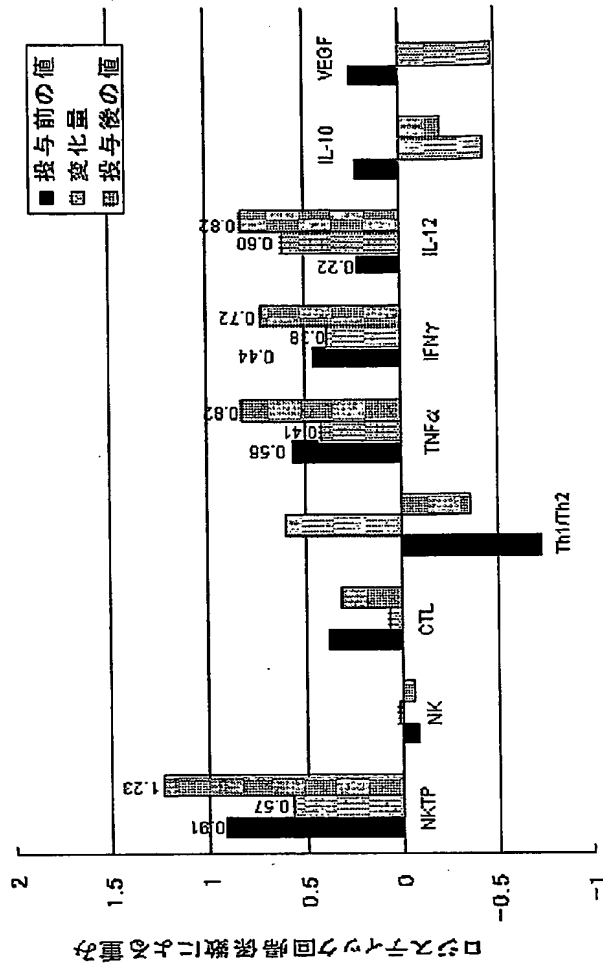
【図 7】



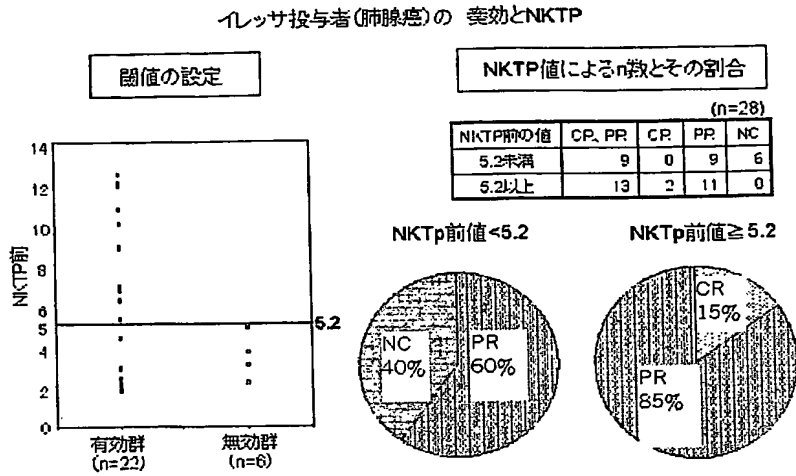
【図 8】

イレッサ投与者における各マーカーの薬効に対する奇与度
(肺腺癌)

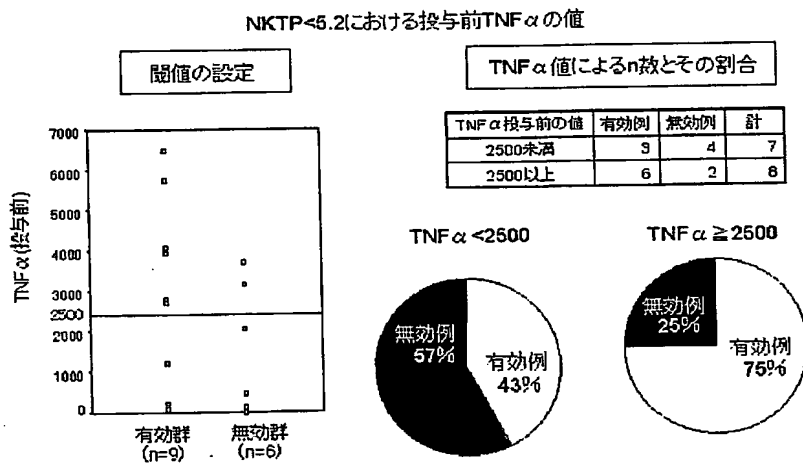
n=28(有効例22:78.6%,無効例6:21.4%)
p=0.575



【図 9】



【図 10】

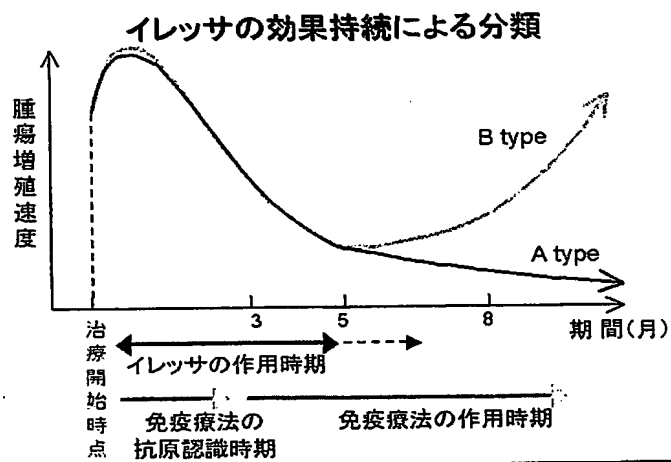


【図 1 1】

	有効	無効
NKTP<5.2、TNF α <2500	3	4
NKTP \geq 5.2またはTNF $\alpha \geq$ 2500	19	2
計	22	6

カイ2乗検定による検定 $p<0.05$

【図 1 2】



【図 13】

イルッサ投与(肺腺癌)におけるAtypeとBtypeの比較					投与前値… イルッサ投与直 前検査値	投与後値… イルッサ投与後 初回検査値
検査項目	Type	N	平均値	標準偏差	平均値の標準 誤差	検定結果(有 意確率)
投与前 NKT活性	A	6	6.333	3.630	1.482	
	B	5	3.640	2.405	1.075	
投与後 NKT活性	A	6	6.233	4.053	1.655	
	B	5	3.820	2.102	0.940	
差 NKT活性	A	6	-0.100	2.395	0.978	
	B	5	0.180	2.362	1.056	
投与前 NK活性	A	6	12.917	6.488	2.649	
	B	5	13.400	9.822	4.393	
投与後 NK活性	A	6	12.750	7.871	3.213	
	B	5	11.560	8.398	3.756	
差 NK活性	A	6	-0.167	2.353	0.960	
	B	5	-1.840	6.452	2.885	
投与前 CTL活性	A	6	12.500	8.284	3.382	
	B	5	11.480	7.463	3.337	
投与後 CTL活性	A	6	13.583	9.404	3.839	
	B	5	14.720	12.137	5.428	
差 CTL活性	A	6	1.083	2.155	0.880	
	B	5	3.240	6.184	2.766	
投与前 TH1/TH2	A	6	6.817	2.551	1.042	
	B	5	15.860	14.663	6.558	
投与後 TH1/TH2	A	6	9.900	5.778	2.359	
	B	5	14.100	11.818	5.285	
差 TH1/TH2	A	6	3.083	3.949	1.612	
	B	5	-1.760	4.820	2.156	
投与前 TH1	A	4	27.775	8.348	4.174	
	B	5	25.340	14.775	6.608	
投与後 TH1	A	4	28.350	9.916	4.958	
	B	5	28.440	14.749	6.596	
差 TH1	A	4	0.575	2.063	1.031	
	B	5	3.100	7.630	3.412	
投与前 TH2	A	4	4.500	0.648	0.324	P<0.001
	B	5	1.960	0.532	0.238	
投与後 TH2	A	4	3.525	0.206	0.103	P<0.01
	B	5	2.300	0.515	0.230	
差 TH2	A	4	-0.975	0.780	0.390	P<0.05
	B	5	0.340	0.522	0.234	

【図 1 4】

検査項目	Type	N	平均値	標準偏差	平均値の標準 誤差	検定結果(有 意確率)
投与前 TNF α	A	6	2818.333	1487.540	607.286	
	B	5	2289.800	1870.253	836.402	
投与後 TNF α	A	6	3310.000	672.547	274.566	
	B	5	1830.000	1638.826	732.905	
差 TNF α	A	6	491.667	1253.019	511.543	
	B	5	-459.800	757.248	338.652	
投与前 IFN γ	A	6	36.467	20.470	8.357	
	B	5	25.800	27.974	12.510	
投与後 IFN γ	A	6	53.750	26.370	10.766	P<0.01
	B	5	18.940	16.312	7.295	
差 IFN γ	A	6	17.283	19.924	8.134	P<0.01
	B	5	-6.860	12.464	5.574	
投与前 IL-12	A	6	34.567	26.319	10.745	
	B	5	52.040	74.336	33.244	
投与後 IL-12	A	6	99.333	70.166	28.645	(*)P<0.05
	B	5	29.680	24.156	10.803	
差 IL-12	A	6	64.767	81.335	33.205	(*)P<0.05
	B	5	-22.360	57.490	25.710	
投与前 IL-10	A	6	418.833	182.670	74.575	
	B	5	268.200	160.161	71.626	
投与後 IL-10	A	6	363.500	173.644	70.890	(*)P<0.05
	B	5	182.800	129.733	58.018	
差 IL-10	A	6	-55.333	105.113	42.912	
	B	5	-85.400	208.118	93.073	
投与前 VEGF	A	4	400.500	228.077	114.038	
	B	5	337.600	174.175	77.893	
投与後 VEGF	A	4	394.500	201.893	100.996	
	B	4	512.500	248.798	124.399	
差 VEGF	A	4	-6.000	34.186	17.093	P<0.05
	B	4	157.750	86.222	43.111	

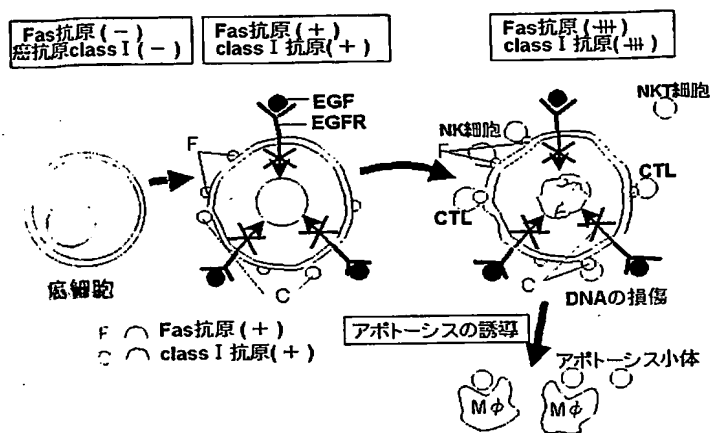
(*)U検定

効果の持続期間 (月)

A type	8.3
B type	5

【図15】

イレッサとNITCとの相乗作用機序(仮説)



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 分子標的治療薬のより有効な効果をもたらすことを目的とし、完全寛解率を上げ、完全寛解への期間の短縮化を達成し、免疫療法との相乗効果を達成するための手段を提供するものである。つまり、CTL活性、NKT活性、NK活性及び-V EGF等に着目する新免疫療法と分子標的治療薬特にチロシンキナーゼ阻害剤の併用による相乗効果の達成を課題とする。

【課題解決手段】 チロシンキナーゼ阻害剤とIL-12産生誘導剤の併用がガン治療における優位な相乗効果を達成することを見出し本発明を完成した。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-169153
受付番号	50300993640
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成15年 6月20日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成15年 6月13日
-------	-------------

次頁無

特願 2 0 0 3 - 1 6 9 1 5 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[3 0 0 0 4 0 3 8 0]

1. 変更年月日

[変更理由]

住 所

氏 名

2 0 0 0 年 5 月 1 6 日

新規登録

東京都三鷹市大沢 1 - 1 - 2 1

株式会社オリエントキャンサーセラピー

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.